

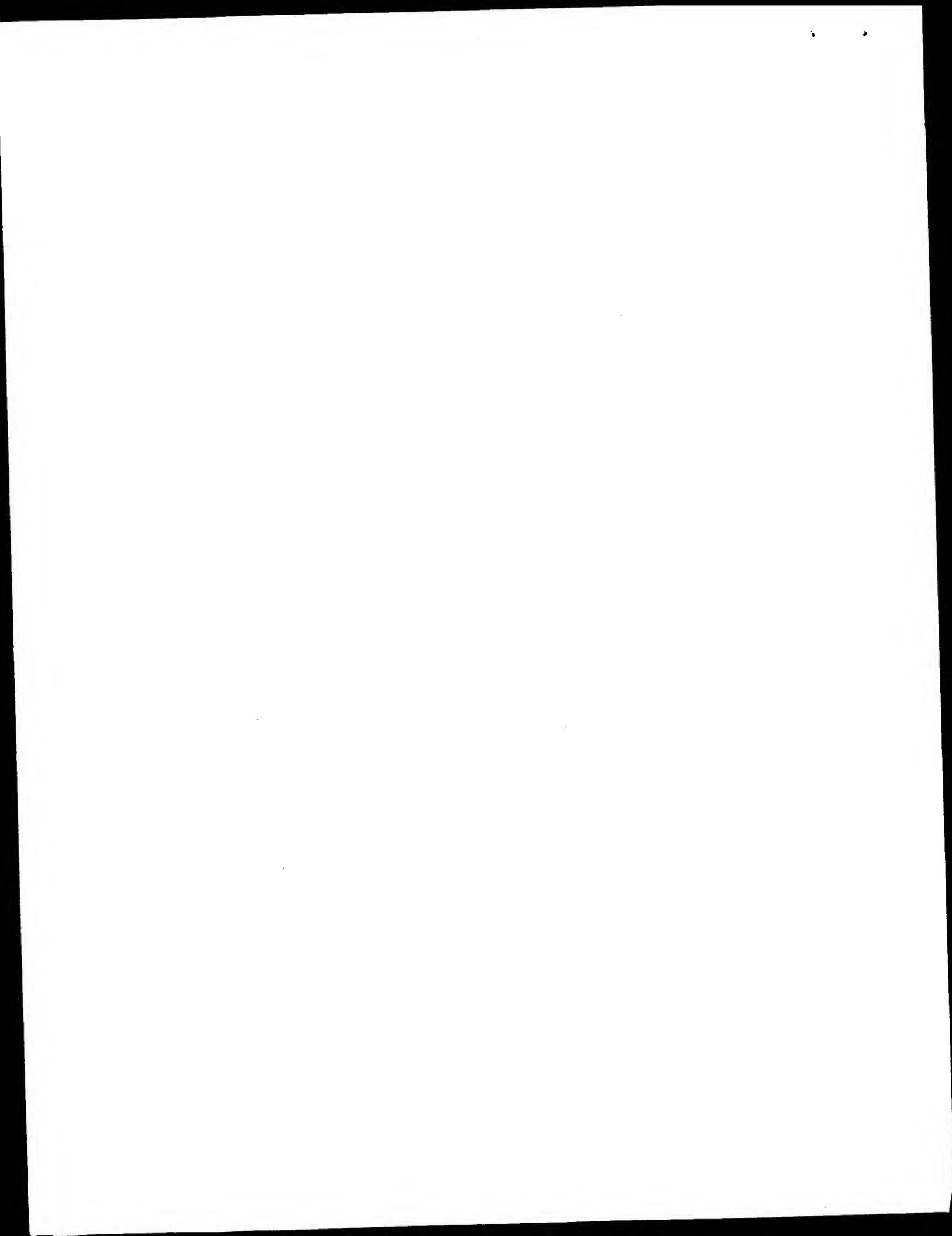
# **Blood substitute suppression by peroxides**

Patent Number: ☐ US6013467  
 Publication date: 2000-01-11  
 Inventor(s): BIRKNER CHRISTIAN (DE); TOWN MICHAEL HAROLD (DE); SIEDEL JOACHIM (DE)  
 Applicant(s):: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)  
 Requested Patent: ☐ DE19628484  
 Application Number: US19990147531 19990317  
 Priority Number(s): DE19961028484 19960715; WO1997EP03750 19970714  
 IPC Classification: C12Q1/26 ; C12Q1/40 ; C12Q1/42 ; C12Q1/48 ; C12Q1/00  
 EC Classification: C12Q1/00, C12Q1/40, C12Q1/42, C12Q1/48  
 Equivalents: CA2261285, ☐ EP0923649 (WO9802570), A1, JP2000515012T, ☐ WO9802570

## **Abstract**

PCT No. PCT/EP97/03750 Sec. 371 Date Mar. 17, 1999 Sec. 102(e) Date Mar. 17, 1999 PCT Filed Jul. 14, 1997 PCT Pub. No. WO98/02570 PCT Pub. Date Jan. 22, 1998 The invention concerns a method for the elimination or/and reduction of interferences which are caused by the presence of free haemoglobin in the determination of an analyte in a sample by optical measurement, wherein one or several peroxidic compounds are added to the analytical reagent or to a part thereof before the measurement. In addition a reagent kit is disclosed which contains at least one peroxidic compound.

Data supplied from the esp@cenet database - I2





⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 196 28 484 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**G 01 N 33/72**  
G 01 N 21/75  
C 12 Q 1/40  
C 12 Q 1/42  
C 12 Q 1/48

⑳ Aktenzeichen: 196 28 484.8  
㉑ Anmeldetag: 15. 7. 96  
㉒ Offenlegungstag: 22. 1. 98

DE 196 28 484 A 1

㉓ Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE  
㉔ Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

㉕ Erfinder:  
Diedel, Joachim, Dr., 82327 Tutzing, DE; Town,  
Michael-Harold, Dr., 82386 Oberhausen, DE; Birkner,  
Christian, Dr., 82449 Uffing, DE

㉖ **Blutersatzmittel-Entstörung durch Peroxide**

㉗ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch Anwesenheit von freiem Hämoglobin hervorgerufen werden, bei der Bestimmung eines Analyten in einer Probe durch optische Messung, wobei man dem Analysenreagenz oder einem Teil davon vor der Messung eine oder mehrere peroxidische Verbindungen zusetzt. Weiterhin wird ein Reagenzienkit offenbart, der mindestens eine peroxidische Verbindung enthält.

DE 196 28 484 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNESDRUCKEREI 11. 97 702 064/116

15/26

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freien Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische Messung unter Zusatz eines Aufhellmittels zum Analysenreagenz. Insbesondere ist dieses Verfahren zur Bestimmung von Bestandteilen einer medizinischen Probe wie etwa der Parameter  $\alpha$ -Amylase, Alkalische Phosphatase und  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase in einer Blut-, Serum- oder Plasmaprobe geeignet.

Gerade bei der Bestimmung klinisch-diagnostisch relevanter Bestandteile in Blut-, Serum- bzw. Plasmaproben kommt es häufig vor, daß diese Probenmaterialien freies Hämoglobin enthalten, d. h. hämolytisch sind. Dabei kann die Hämolyse entweder die Folge von aus Erythrozyten freigesetztem nativem Hämoglobin oder der therapeutischen Anwendung von Blutersatzmitteln auf Basis nichtzellulärer Hämoglobinderivate sein.

Speziell bei Verwendung von photometrischen Bestimmungsmethoden ist in vielen Fällen die Analyse solcher Hämoglobin enthaltender Proben im wesentlichen aufgrund der spektralen Eigenschaften von Hämoglobin bzw. Hämoglobinderivaten gestört oder gänzlich unmöglich. Dies gilt insbesondere dann, wenn die photometrische Messung mit einer Wellenlänge durchgeführt wird, bei der eine starke Absorption von Hämoglobin stattfindet, beispielsweise bei Wellenlängen zwischen ca. 400–420 nm und wenn gleichzeitig ein hoher Hämoglobingehalt in der Probe, d. h. üblicherweise  $> 500$  mg/dl vorliegt.

Die Frage nach der Beseitigung solcher durch Hämolyse verursachten Analysenstörungen stellt sich mit der Verfügbarkeit von Blutersatzmitteln auf Basis von Hämoglobinderivaten in weitaus stärkerem Maße als bisher. Nach ihrer therapeutischen Verabreichung können im Blut-Serum oder -Plasma Hämoglobin-Spiegel von bis zu ca. 2000 mg/dl auftreten, wobei erschwerend hinzukommt, daß sich in diesem Fall das Vorhandensein von freiem Hämoglobin in der Probe auch nicht durch geeignete Vorsichtsmaßnahmen bei der Serum- bzw. Plasma-Gewinnung aus der Blutprobe vermeiden läßt.

Es besteht daher ein Bedarf an einem Verfahren, welches es ermöglicht, auch in stark hämolytischen, beispielsweise Blutersatzmittel bis zu Konzentrationen von mindestens 2000 mg/dl enthaltenden Serum- bzw. Plasmaproben störungsfrei photometrische Bestimmungen diagnostisch wichtiger Analyten durchführen zu können.

Gelöst wurde die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Verfahren zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch Anwesenheit von freiem Hämoglobin hervorgerufen werden, bei der Bestimmung eines Analyten in einer Probe durch optische Messung, wobei man dem für die Bestimmung des Analyten verwendeten Reagenz oder einem Teil davon eine oder mehrere peroxidische Verbindungen zusetzt.

Durch den erfindungsgemäßen Zusatz von peroxidischen Verbindungen zum Analysereagenz oder einem oder mehreren Teilreagenzien können einerseits spektrale Störungen durch das in der Probe vorhandene Hämoglobin beseitigt werden. Andererseits können auch Störungen beseitigt werden, die durch Wechselwirkungen von Hämoglobin mit in der Probe vorhandenen weiteren Substanzen auftreten.

Das Reagenz, welches der Probe zugesetzt wird, kann in flüssiger oder fester Form vorliegen. Für Analytbestimmungen, die in flüssiger Phase durchgeführt werden, wird man vorzugsweise der Probe auch ein flüssiges Reagenz zusetzen. Bei Trockentests kann das Reagenz aber auch in fester Form, z. B. in Form von imprägnierten Fasern oder Vliesen vorliegen.

Als peroxidische Substanzen kommen sowohl anorganische als auch organische Peroxide in Frage. Bevorzugt sind anorganische peroxidische Verbindungen wie etwa  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Peroxide, Perborate, Persulfate, Peroxodisulfate, Percarbonate etc. Besonders bevorzugt werden die peroxidischen Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Perboraten wie etwa  $\text{NaBO}_2 \times \text{H}_2\text{O}_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$  bzw.  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}_2 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ .

Die Endkonzentration der peroxidischen Verbindungen im Testansatz kann über einen breiten Bereich variiert werden. Sie beträgt vorzugsweise 1–500 mmol/l und besonders bevorzugt 5–200 mmol/l bezogen auf den Gehalt an  $\text{O}_2^{2-}$  im Testansatz.

Durch den Zusatz peroxidischer Verbindungen kommt es nach dem Vermischen der Probe mit dem Analysereagenz zu einer raschen Ausbleichung der vom Hämoglobin bzw. Hämoglobinderivat hervorgerufenen Färbung, ohne daß gleichzeitig eine sich im selben Reaktionsansatz anschließende Bestimmung des Analyten wie z. B. eines Enzyms mittels chromogener Substrate signifikant beeinträchtigt wird. Dieser Befund ist sehr überraschend, da keinesfalls vorhergesehen werden konnte, daß peroxidische Verbindungen auch in höheren Konzentrationen sowie innerhalb des für photometrische Serum- bzw. Plasmaanalysen üblicherweise verwendeten Temperaturbereichs, d. h. im allgemeinen von 25–37°C, auch über eine längere Einwirkungszeit, d. h. vorzugsweise über mindestens 1 min und besonders bevorzugt über mindestens 2–10 min hinweg keine Beeinflussung von enzymatischen Aktivitäten und/oder eine Störung der jeweiligen Indikatorreaktion verursachen.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere für optische Messungen, die bei mindestens einer Meßwellenlänge durchgeführt werden, bei der natives Hämoglobin bzw. synthetische Hämoglobinderivate eine Absorption aufweisen. Besonders bevorzugt wird das Verfahren bei optischen Messungen in den Meßwellenlängenbereichen von etwa 380–450 nm und insbesondere von 400–420 nm oder/und 520–590 nm durchgeführt, wo Hämoglobin seine Haupt- bzw. Nebenabsorptionen aufweist.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Bestimmung beliebiger Proben, in denen freies Hämoglobin vorliegt. Beispiele für solche Proben sind nativ hämolytische Blut-, Serum- oder Plasmaproben oder Proben, die ein Blutersatzmittel auf Basis von Hämoglobinderivaten enthalten. Beispiele für Blutersatzmittel, die im Sinne der vorliegenden Erfindung unter dem Begriff "freies Hämoglobin" fallen, sind modifizierte oder intramolekular oder intermolekular vernetzte bzw. polymerisierte Derivate von Hämoglobinen, insbesondere von Humanhämoglobin oder Rinderhämoglobin, z. B. DCL-Hämoglobin (Diaspirin-Crosslinked-Hämoglobin), sowie rekombinant z. B. aus Mikroorganismen gewonnene Hämoglobin-Muteine (vgl. z. B. "Blood Substitutes", R.M. Winslow, K.D. Vandegriff, M. Intaglietta (Hrsg.), Birkhäuser, Boston 1995 und EP-A-0700 997).

In einer bestimmten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich bei dem zu bestimmenden Analyten um ein Enzym. Bevorzugte Enzyme sind ausgewählt aus der Gruppe der Hydrolasen wie z. B.

$\alpha$ -Amylase, Alkalische Phosphatase und  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT). Darüberhinaus ist das erfindungsgemäße Verfahren auch zur Bestimmung anderer Analyten geeignet.

Als Probe beim erfindungsgemäßen Verfahren wird vorzugsweise eine medizinische Probe, z. B. eine Blut-, Serum- oder Plasmaprobe eingesetzt, insbesondere eine humane Serum- oder Plasmaprobe.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß es in einem Analyseautomaten durchgeführt werden kann, z. B. an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 704- oder 717-Analysegerät.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bestimmung des Analyten im erfindungsgemäßen Verfahren als Mehr-Schritt-Test, z. B. als Zwei-Schritt-Test durchgeführt, wobei der Probe nacheinander mindestens zwei Teilreagenzien zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugesetzt werden. Bei einer solchen Mehr-Schritt-Testführung werden die peroxidischen Verbindungen vorzugsweise dem Teilreagenz zugefügt, das als erstes der Probe zugesetzt wird. Die eigentliche Analytbestimmung erfolgt dann vorzugsweise frühestens nach Zugabe des zweiten Teilreagenzes, das z. B. im Falle einer Enzymbestimmung ein chromogenes Farbsubstrat enthalten kann.

Wenn bei einer Mehr-Schritt-Testführung die peroxidischen Verbindungen zusammen mit einem ersten Teilreagenz zugesetzt werden, können das zweite oder mindestens eines der weiteren Teilreagenzien dann gegebenenfalls noch ein Mittel enthalten, mit dem die aus dem ersten Teilreagenz stammenden überschüssigen peroxidischen Verbindungen wieder entfernt werden, um die etwaigen Störungen von anderen, im gleichen Reaktionsgefäß anschließend durchgeführten Analysen aufgrund von sogenannten Verschleppungseffekten zu vermeiden.

Werden als Peroxide  $H_2O_2$  oder/und Perborate eingesetzt, so umfaßt das Mittel zur Entfernung der peroxidischen Verbindungen vorzugsweise ein Peroxid-umsetzendes Enzym wie etwa Katalase oder/und Peroxidase gegebenenfalls zusammen mit einem oder mehreren geeigneten Substraten des Peroxid-umsetzenden Enzyms.

Weiterhin kann dem Analysenreagenz oder einem Teilreagenz davon zur Vermeidung der Bildung von Superoxidradikalen  $O_2^-$  noch Superoxiddismutase zugesetzt werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann ohne weitere Maßnahmen eine Wiederfindung des nachzuweisenden Analyten auch in hämolytischen Proben von  $100 \pm 10\%$  und vorzugsweise  $100 \pm 5\%$  erreicht werden, wenn zum ersten Meßzeitpunkt die Ausbleichung von Hämoglobin oder Hämoglobinderivat durch die peroxidischen Verbindungen im wesentlichen vollständig abgeschlossen oder zum Stillstand gekommen ist. Ist dagegen die Ausbleichreaktion zu Beginn der Messung noch nicht zum Stillstand gekommen, was gegebenenfalls bei einer sehr hohen Hämoglobin-Konzentration in der Probe und/oder einem verhältnismäßig hohen Probe- zu Reagenz-Volumenverhältnis der Fall sein kann, so kann zum Erreichen der gewünschten Analysengenauigkeit bevorzugt noch eine Leewertkorrektur durchgeführt werden. Diese Leewertkorrektur kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß man von dem Meßsignal, welches mit dem peroxid- und chromogenhaltigen Reagenz erhalten wird, das Leewertsignal abzieht, welches im gleichen Meßzeitraum in einem parallelen Testansatz mit dem ebenfalls peroxidhaltigen, jedoch chromogenfreien Reagenz erhalten wird. Besonders bevorzugt erfolgt die Leewertkorrektur durch Abziehen eines kinetischen Leewerts.

Bei einem Zwei-Schritt-Test erfolgt die Bestimmung des Leewerts vorzugsweise derart, daß ein peroxidhaltiges erstes Teilreagenz (R1), vorzugsweise ein Reagenz mit gleicher Peroxidkonzentration wie im Testansatz, und nachfolgend ein chromogenfreies zweites Teilreagenz (R2) zur Probe gegeben wird und aus diesem Testansatz dann der vom Meßsignal abzuziehende Leewert ermittelt wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe durch optische Messung, der neben den zur Analytbestimmung erforderlichen Komponenten mindestens eine peroxidische Verbindung zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch freies Hämoglobin hervorgerufen werden, enthält. Vorzugsweise besteht der Reagenzienkit aus mindestens zwei räumlich voneinander getrennten Teilreagenzien. Ein Teilreagenz enthält vorzugsweise die peroxidische Verbindung getrennt von allen anderen Komponenten. In diesem Teilreagenz kann die peroxidische Verbindung in fester oder flüssiger Form, z. B. als Pulver oder Tablette oder auch als stabilisierte Lösung vorliegen. Das die peroxidische Verbindung enthaltende Teilreagenz wird vor der Durchführung des Tests vorzugsweise mit einem weiteren Teilreagenz vermischt.

Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit zur Bestimmung von Enzymen enthält vorzugsweise ein erstes die peroxidische Verbindung enthaltendes Teilreagenz, ein weiteres mit der peroxidischen Verbindung mischbares Teilreagenz und ein separates Reagenz, welches ein chromogenes Farbsubstrat enthält.

Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit zur Bestimmung von  $\alpha$ -Amylase umfaßt vorzugsweise ein erstes Teilreagenz, welches die peroxidische Verbindung enthält, ein weiteres mit der peroxidischen Verbindung kompatibles Teilreagenz, welches gegebenenfalls ein  $\alpha$ -Amylase-Hilfsenzym wie etwa  $\alpha$ -Glucosidase oder/und einen Antikörper enthält, sowie ein weiteres Teilreagenz, das ein chromogenes  $\alpha$ -Amylasesubstrat, beispielsweise ein oligomeres Glucosid enthält.

Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase umfaßt vorzugsweise ein erstes, die peroxidische Verbindung enthaltendes Teilreagenz. Ein weiteres Teilreagenz, welches mit dem ersten Teilreagenz kompatibel ist, enthält vorzugsweise einen geeigneten alkalischen Puffer, und ein weiteres Teilreagenz, enthält ein chromogenes Substrat der Alkalischen Phosphatase, z. B. einen Phosphatester wie etwa 4-Nitrophenylphosphat.

Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit zur Bestimmung von  $\gamma$ -Glutamyltransferase umfaßt vorzugsweise ein erstes, die peroxidische Verbindung enthaltendes Teilreagenz, ein zweites Teilreagenz, welches einen geeigneten Puffer enthält, und ein weiteres Teilreagenz, das ein chromogenes Substrat der  $\gamma$ -GT, z. B. L- $\gamma$ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid enthält.

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch die beigefügten Abbildungen sowie die nachfolgenden Beispiele erläutert werden.

Es zeigten:

Abb. 1 den zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer Bestimmung von Alkalischer Phosphatase in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an Hämoglobinderivat ohne Zusatz einer peroxidischen Verbindung;

Abb. 2 den zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer Bestimmung von Alkalischer Phosphatase in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an Hämoglobinderivat unter Zusatz einer peroxidischen Verbindung (1—4) bzw. den zeitlichen Verlauf des Meßsignals für eine Leerwertkorrektur (1'—4');

Abb. 3 den zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer  $\alpha$ -Amylasebestimmung in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an Hämoglobinderivat ohne Zusatz einer peroxidischen Verbindung;

Abb. 4 die zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer  $\alpha$ -Amylase Bestimmung in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an Hämoglobinderivat unter Zusatz einer peroxidischen Verbindung (1—4) bzw. den zeitlichen Verlauf des Signals für eine Leerwertkorrektur (1'—4');

Abb. 5 den zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer Bestimmung von  $\gamma$ -GT in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an Hämoglobinderivat ohne Zusatz einer peroxidischen Verbindung;

Abb. 6 den zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer  $\gamma$ -GT Bestimmung in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an HB-Derivat unter Zusatz einer peroxidischen Verbindung (1—7) und

Abb. 7 den zeitlichen Verlauf des Signals für eine parallel zu den Versuchen in Abb. 6 durchgeführten Leerwertkorrektur (1'—7').

## Beispiele

### Beispiel 1

#### Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (AP) in Hämoglobinderivat-haltigem Serum

##### 1.1. Probenmaterial

Je 0,40 ml eines Humanserumpools werden mit 0,01—0,10 ml Hämoglobin-Derivat (di-aspirin crosslinked hemoglobin, 'DCIHb', 10 g/dl; Fa. Baxter) in Stufen von 0,01 ml aufgestockt und zum Volumenausgleich mit 0,9% NaCl-Lösung auf jeweils 0,50 ml aufgefüllt (DCIHb-Konzentration 200—2000 mg/dl).

Als Kontrolle wird eine Mischung von 0,40 ml des selben Serumpools mit 0,10 ml 0,9%iger wäßriger NaCl-Lösung mitgeführt.

##### 1.2. Reagenzien

###### 1.2.1. Alkalische Phosphatase-Grundreagenz (entsprechend Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie)

AP DGKCh (Sys 2-Packung, Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 1 662 902); Zusammensetzung:

R1:	D(—)-N-Methylglucamin·HCl (pH 10,1)	610 mmol/l
	Mg-Acetat	0,61 mmol/l
	NaCl	85,4 mmol/l
R2:	4-Nitrophenylphosphat	122 mmol/l

###### 1.2.2. Alkalische Phosphatase-Reagenz mit Peroxid-Zusatz

Wie 1.2.1., nur daß zu R1 noch  $H_2O_2$  zu einer Konzentration von 147 mmol/l zugesetzt wird (0,5 ml Perhydrol 30%ig pro 30 ml R1) ( $H_2O_2$ -Endkonzentration im Test = 120 mmol/l).

##### 1.3. Durchführung der Bestimmung

Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase wurde am Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysenautomat bei 37°C mit Geräteeinstellungen gemäß der Arbeitsvorschrift der Packungsbeilage durchgeführt (5  $\mu$ l Probe, 250  $\mu$ l R1, 50  $\mu$ l R2; Wellenlängen 700/405 nm; Meßintervall 30.—38. Meßpunkt).

##### 1.4. Ergebnisse

###### 1.4.1. Reaktionskinetik (zeitlicher Extinktionsverlauf)

Abb. 1 zeigt den zeitlichen Extinktionsverlauf im Alkalische Phosphatase-Test bei Verwendung des Grundreagenzes (1.2.1) und folgender Proben:

— Kurve 1: 0,9% NaCl (= Reagenzleerwert)

- Kurve 2: Serum ohne DCIHb
- Kurve 3: Serum mit 1000 mg/dl DCIHb
- Kurve 4: Serum mit 2000 mg/dl DCIHb.

Zumindest mit dem Serum mit einem DCLHb-Gehalt von 2000 mg/dl wird mit ca. 2,3 eine Ausgangsextinktion erreicht, die an der photometrischen Erfassungsgrenze liegt und keine zuverlässige Bestimmung der Enzymaktivität mehr erlaubt.

Dagegen führt, wie aus Abb. 2 ersichtlich (Zuordnung der Extinktionsverläufe zu den verschiedenen Proben wie bei Abb. 1), die Anwesenheit von Peroxid in R1 des Alkalische Phosphatase-Reagenzes zu einer raschen Absenkung der vom Hämoglobin-Derivat verursachten Ausgangsextinktion, so daß zu Beginn des Meßintervalls (Meßpunkt 30) auch bei dem auf 2000 mg/dl mit DCIHb aufgestockten Serum eine Anfangsextinktion von weniger als 0,2 erreicht wird. Eine der Farbbildung aus dem chromogenen Substrat im Meßintervall evtl. noch unterlagerte weitere Hämoglobin-Ausbleichung läßt sich durch Mitführen eines separaten Reaktionsansatzes mit chromogenfreiem R2 (= R1 aus dem Grundreagenz) ermitteln und bei der Berechnung der AP-Aktivität in Korrektur bringen (Kurven 1'—4' der Abb. 2).

#### 1.4.2 Alkalische Phosphatase-Wiederfindung

In nachfolgender Tabelle sind die Daten zur Wiederfindung der Alkalischen Phosphatase in dem mit unterschiedlichen DCIHb-Mengen aufgestockten Serum-Pool bei Verwendung (a) des herkömmlichen AP-Reagenzes und (b) des mit  $H_2O_2$  in R1 versetzten AP-Reagenzes aufgelistet:

		Wiederfindung Alkalische Phosphatase*					
		Reagenz ohne $H_2O_2$ -Zusatz		Reagenz mit $H_2O_2$ -Zusatz			
Proben-Nr.	DCIHb-Konzentration (mg/dl)			ohne Leerwertkorrektur		mit Leerwertkorrektur	
		U/l	%	U/l	%	U/l	%
1	0	275	(100)	272	99	272	99
2	200	254	92	272	99	273	99
3	400	239	87	268	98	270	98
4	600	232	84	265	96	269	98
5	800	216	78	262	95	267	97
6	1.000	200	73	262	95	268	98
7	1.200	188	68	259	94	267	97
8	1.400	176	64	262	95	272	99
9	1.600	162	59	258	94	268	98
10	1.800	146	53	257	94	271	99
11	2.000	139	50	249	91	262	95

\*) Kalibration der Tests jeweils mit Calibrator for Automated Systems, Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 759 350

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die Wiederfindung der alkalischen Phosphatase mit dem herkömmlichen Analysenreagenz mit steigender Probenkonzentration an Hämoglobin-Derivat erheblich abnimmt, während sie mit dem erfindungsgemäßen Peroxid-Zusatz auch bei 2000 mg DCIHb/dl noch bei über 90% (Berechnung ohne Leerwertkorrektur) bzw.  $\geq 95\%$  (Berechnung mit Leerwertkorrektur) liegt.

Identische Ergebnisse werden auch erhalten, wenn der Serumpool anstelle von DCIHb mit dem Hämoglobin-Derivat der Fa. Somatogen (rekombinantes Human-Hämoglobin aus E. coli mit intramolekularer di- $\alpha$ -Fusion) aufgestockt wird.

Das Resultat ändert sich auch nicht, wenn R1 anstelle von  $H_2O$  als Peroxid Natrium-Perborat ( $NaBO_2 \cdot H_2O_2 \cdot 3 H_2O$ ) zugesetzt wird; z. B. wurden bei Perborat-Konzentrationen von 14,4 bzw. 28,8 mmol/l R1

(Endkonzentration im Test = 11,8 bzw. 23,6 mmol/l) folgende AP-Wiederfindungen gemessen:

Probe	DCLHb-Gehalt (mg/dl)	Wiederfindung Alkalische Phosphatase (%)		
		R1 ohne Perborat	R1 mit Perborat, 14,4 mmol/l	R1 mit Perborat, 28,8 mmol/l
1	0	(100)	103*	103*
2	2.000	67	101*	102*

\*) korrigiert über Abzug des kinetischen Leerwerts (Testansatz mit chromogenfreiem R2)

Schließlich werden auch keine davon abweichenden Ergebnisse erhalten, wenn R2 zum Peroxidabbau z. B. noch Katalase zugesetzt wird.

## Beispiel 2

### Bestimmung der $\alpha$ -Amylase in Hämoglobinderivat-haltigem Serum

#### 2.1. Probenmaterial

Art und Herstellung s. Beispiel 1, Punkt 1.1.

#### 2.2. Reagenzien

##### 2.2.1. Amylase-Grundreagenz

$\alpha$ -Amylase EPS liquid (Sys 2-Packung, Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 1555 693); Zusammensetzung:

R1:	$\alpha$ -Glucosidase	$\geq 4$ U/ml
	HEPES-Puffer (pH 7,15)	52,5 mmol/l
	NaCl	87,0 mmol/l
	MgCl <sub>2</sub>	12,6 mmol/l
R2:	4,6-Ethyliden-G7 PNP	22,0 mmol/l
	HEPES-Puffer (pH 7,15)	52,5 mmol/l

##### 2.2.2. Amylase-Reagenz mit Peroxid-Zusatz

Wie 2.2.1, nur daß R1 noch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf eine Konzentration von 147 mmol/l zugesetzt wird (0,5 ml Perhydrol 30%ig pro 30 ml R1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Endkonzentration im Test = 118 mmol/l).

#### 2.3. Durchführung der Bestimmung

Die Amylase-Bestimmung wurde am Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysenautomat bei 37°C mit Geräteeinstellungen gemäß der Arbeitsvorschrift der Packungsbeilage durchgeführt (10  $\mu$ l Probe, 250  $\mu$ l R1,



50 µl R2; Wellenlängen 700/405 nm; Meßintervall 40.—50. Meßpunkt).

## 24. Ergebnisse

### 24.1. Reaktionskinetik (zeitlicher Extinktionsverlauf)

Abb. 3 zeigt den zeitlichen Extinktionsverlauf im Amylase-Test bei Verwendung des Grundreagenzes (22.1) und folgenden Proben:

- Kurve 1: 0,9% NaCl (= Reagenzleerwert)
- Kurve 2: Serum ohne DCIHb
- Kurve 3: Serum mit 1000 mg/dl DCIHb
- Kurve 4: Serum mit 2000 mg/dl DCIHb.

Aus Abb. 3 ist zu ersehen, daß schon bei einer DCIHb-Konzentration von 1000 mg/dl im herkömmlichen Amylase-Test eine Grundextinktion von mehr als 2 erreicht wird, während bei der mit DCIHb zu 2000 mg/dl aufgestockten Probe der Meßbereich des Photometers überschritten wird und somit eine Bestimmung der Amylase völlig unmöglich ist.

Dagegen führt, wie aus Abb. 4 ersichtlich (Zuordnung der verschiedenen Extinktionsverläufe zum Probenmaterial wie bei Abb. 3), der Zusatz von Peroxid zu R1 des Amylase-Reagenzes zu einer raschen Absenkung der vom Hämoglobin-Derivat verursachten Ausgangsextinktion, so daß zu Beginn des Meßintervalls (Meßpunkt 40) auch bei dem auf 2000 mg/dl mit DCIHb aufgestockten Serum eine Anfangsextinktion von nur ca. 0,3 erreicht wird. Analog der AP-Bestimmung empfiehlt es sich auch hier, zur Erfassung einer weiteren Hämoglobin-Ausbleichung im Meßfenster einen separaten Reaktionsansatz mit chromogenfreiem R2 (= R1 aus dem Grundreagenz) mitzuführen und bei der Berechnung der Amylase-Aktivität in Korrektur zu bringen (Kurven 1'—4' der Abb. 4).

### 24.2. Amylase-Wiederfindung

In nachfolgender Tabelle sind die Daten zur Amylase-Wiederfindung in dem mit unterschiedlichen DCIHb-Mengen aufgestockten Serum-Pool bei Verwendung (a) des herkömmlichen Amylase-Reagenzes und (b) des gleichen, jedoch mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in R1 versetzten Amylase-Reagenzes aufgelistet:

Wiederfindung Amylase*					
Proben Nr.	DCIHb-Konzentration (mg/dl)	Reagenz ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Zusatz		Reagenz mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Zusatz**	
		U/l	%	U/l	%
1	0	122	(100)	119	98
2	200	95	78	114	93
3	400	79	65	120	98
4	600	84	69	117	96
5	800	76	62	115	94
6	1.000	83	68	113	93
7	1.200	88	72	117	95
8	1.400	86	71	114	93
9	1.600	69	57	112	92
10	1.800	65	53	111	91
11	2.000	- 13	- 11	112	92

\*) Kalibration der Tests jeweils mit Calibrator for Automated Systems, Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 759 350

\*\*) korrigiert über Abzug des kinetischen Leerwerts (Testansatz mit chromogenfreiem R2)

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die Amylase-Wiederfindung mit dem herkömmlichen Reagenz bei steigender DCIHb-Konzentration abnimmt und bei 2000 mg/dl sogar negative Werte erreicht, während sie durch den erfindungsgemäßen Peroxid-Zusatz immer über 90% beträgt.

Im übrigen gelten die für die AP-Bestimmung gemachten Aussagen analog.

### Beispiel 3

Bestimmung der  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT) in Hämoglobinderivat-haltigem Serum

#### 3.1. Probenmaterial

Art und Herstellung s. Beispiel 1, Punkt 1.1.

#### 3.2. Reagenzien

##### 3.2.1. $\gamma$ -GT-Grundreagenz

Gamma-GT (Sys 2-Packung, Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 1 489 496); Zusammensetzung:

R1: NaOH 76 mmol/l  
 Glycylglycin 150 mmol/l  
 (pH 7,7)  
 R2: L- $\gamma$ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid 6 mmol/l R1

3.2.2.  $\gamma$ -GT-Reagenz mit Peroxid-Zusatz

Wie 3.2.1, nur daß zu R1 noch  $H_2O_2$  auf eine Konzentration von 147 mmol/l gegeben wird (0,5 ml Perhydrol 30%ig pro 30 ml R1) ( $H_2O_2$ -Endkonzentration im Test = 116 mmol/l).

3.3. Durchführung der  $\gamma$ -GT-Bestimmung

Die  $\gamma$ -GT-Bestimmung wurde am Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysenautomat bei 37°C mit Geräteeinstellungen gemäß der Arbeitsvorschrift der Packungsbeilage durchgeführt (15  $\mu$ l Probe, 250  $\mu$ l R1 50  $\mu$ l R2; Wellenlängen 660/405 nm; Meßintervall 30. — 50. Meßpunkt).

## 3.4. Ergebnisse

## 3.4.1. Reaktionskinetik (zeitlicher Extinktionsverlauf)

Abb. 5 zeigt den zeitlichen Extinktionsverlauf im  $\gamma$ -GT-Test bei Verwendung des Grundreagenzes (3.2.1) und folgenden Proben:

- Kurve 1: 0,9% NaCl (= Reagenzleerwert)
- Kurve 2: Serum ohne DCIHb
- Kurve 3: Serum mit 400 mg DCIHb/dl
- Kurve 4: Serum mit 800 mg DCIHb/dl
- Kurve 5: Serum mit 1200 mg DCIHb/dl
- Kurve 6: Serum mit 1600 mg DCIHb/dl
- Kurve 7: Serum mit 2000 mg DCIHb/dl

Aus Abb. 5 ist zu ersehen, daß schon bei einer DCIHb-Konzentration von 800 mg/dl im herkömmlichen  $\gamma$ -GT-Test eine Grundextinktion von mehr als 2 erreicht wird, während bei den mit DCIHb auf mehr als 1600 mg/dl aufgestockten Proben der Meßbereich des Photometers überschritten wird und somit von vorneher- ein keine Bestimmung der  $\gamma$ -GT mehr möglich ist.

Dagegen führt, wie aus Abb. 6 ersichtlich (Zuordnung der Extinktionsverläufe zu den verschiedenen Proben wie bei Abb. 5), die Anwesenheit von Peroxid in R1 des  $\gamma$ -GT-Reagenzes zu einer raschen Absenkung der vom Hämoglobin-Derivat verursachten Ausgangsextinktion, so daß zu Beginn des Meßintervalls (Meßpunkt 30) auch bei dem auf 2000 mg/dl mit DCIHb aufgestockten Serum eine Anfangsextinktion von nur knapp mehr als 1 erreicht wird.

Der dem von der Umsetzung des chromogenen Substrats herrührenden Farbsignal noch unterlagerte weitere Hämoglobin-Ausbleicheffekt läßt sich auch hier, analog Beispielen 1 und 2, in einem parallelen Testansatz mit  $H_2O_2$ -haltigem R1 und mit R1 des Grundreagenzes als chromogenfreiem R2 ermitteln (Kurven 1'—7' der Abb. 7) und bei der Berechnung für die  $\gamma$ -GT-Wiederfindung berücksichtigen.

2.4.2.  $\gamma$ -GT-Wiederfindung

In nachfolgender Tabelle sind die Daten zur  $\gamma$ -GT-Wiederfindung in dem mit unterschiedlichen DCIHb-Mengen aufgestockten Serum-Pool bei Verwendung (a) des herkömmlichen  $\gamma$ -GT-Reagenzes und (b) des mit  $H_2O_2$  in R1 versetzten  $\gamma$ -GT-Reagenzes aufgelistet:

Wiederfindung $\gamma$ -GT*					
Proben-Nr.	DCIHb-Konzentration (mg/dl)	Reagenz ohne $H_2O_2$ -Zusatz		Reagenz mit $H_2O_2$ -Zusatz**	
		U/l	%	U/l	%
1	0	53,3	(100)	52,3	98
2	200	31,9	60	49,6	93
3	400	17,0	32	48,2	90
4	600	- 1,7	- 3	49,8	93
5	800	- 9,1	- 17	48,5	91
6	1.000	- 24,8	- 47	48,1	90
7	1.200	- 30,0	- 56	49,4	93
8	1.400	- 30,1	- 56	51,9	97
9	1.600	- 9,5	- 18	51,8	97
10	1.800	- 10,4	- 19	50,0	94
11	2.000	- 10,3	- 19	50,8	95

\*) Kalibration der Tests jeweils mit Calibrator for Automated Systems, Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 759 350

\*\*) korrigiert über Abzug des kinetischen Leerwerts (Testansatz mit chromogenfreiem R2)

Aus der Tabelle ist zu ersehen) daß die  $\gamma$ -GT-Wiederfindung mit dem herkömmlichen Reagenz mit steigender DCIHb-Konzentration sehr schnell absinkt und bereits ab 600 mg/dl sogar negative Werte annimmt, während sie beim Reagenz mit dem erfindungsgemäßen Peroxid-Zusatz immer  $\geq 90\%$  beträgt.

Bezüglich der Ergebnisse mit dem Hämoglobinderivat der Fa. Somatogen, dem Einsatz von Natrium-Perborat anstelle von  $H_2O_2$  sowie dem fakultativen Zusatz von Katalase zu R2 gelten im übrigen die für die AP-Bestimmung gemachten Angaben analog.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch Anwesenheit von freiem Hämoglobin hervorgerufen werden, bei der Bestimmung eines Analyten in einer Probe durch optische Messung, dadurch gekennzeichnet, daß man dem zur Bestimmung des Analyten verwendeten Reagenz oder einem Teil davon eine oder mehrere peroxidische Verbindungen zusetzt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man anorganische peroxidische Verbindungen verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die peroxidischen Verbindungen ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus  $H_2O_2$  und Perboraten.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß man die optische Messung bei mindestens einer Meßwellenlänge durchführt, bei der Hämoglobin eine Absorption aufweist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die optische Messung bei Meßwellenlängen von 380—450 nm oder/und 520—590 nm durchführt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—5, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Analyten bestimmt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  $\alpha$ -Amylase, Alkalischer Phosphatase und  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß die Endkonzentration der peroxidischen Verbindungen im Testansatz 1—500 mmol/l bezogen auf den Gehalt an  $O_2^{2-}$  beträgt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Endkonzentration 5—200 mmol/l beträgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—8, dadurch gekennzeichnet, daß die Einwirkungszeit der peroxidischen Verbindungen auf die Probe vor der Messung mindestens 1 Minute beträgt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung als Mehr-Schritt-Test durchgeführt wird, wobei der Probe mindestens zwei Teilreagenzien zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugesetzt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die peroxidischen Verbindungen mit dem ersten Teilreagenz zugesetzt werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—11, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe bestimmt, die ein Blutersatzmittel enthält.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—12, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung an einer Serum- oder Plasmaprobe durchgeführt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—13, dadurch gekennzeichnet, daß man die Bestimmung in einem Analyseautomaten durchführt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß man das bei der Analytenbestimmung erhaltene Meßsignal einer Leerwertkorrektur unterzieht.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man vom Meßsignal den kinetischen Leerwert abzieht.
17. Reagenzienkit zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe durch optische Messung, dadurch gekennzeichnet, daß er neben den zur Analytbestimmung erforderlichen Komponenten mindestens eine peroxidische Verbindung zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch freies Hämoglobin hervorgerufen werden, enthält.
18. Reagenzienkit nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß er aus mindestens zwei räumlich voneinander getrennten Teilreagenzien besteht, wobei ein Teilreagenz die peroxidische Verbindung und das oder die anderen Teilreagenzien weitere Testkomponenten enthalten.
19. Reagenzienkit nach Anspruch 17 oder 18, zur Bestimmung von  $\alpha$ -Amylase, umfassend ein erstes Teilreagenz, das eine peroxidische Verbindung enthält, ein zweites Teilreagenz, das einen geeigneten Puffer und gegebenenfalls ein  $\alpha$ -Amylase-Hilfsenzym oder/und einen Antikörper enthält, und ein weiteres Teilreagenz, das ein chromogenes  $\alpha$ -Amylasesubstrat enthält.
20. Reagenzienkit nach Anspruch 17 oder 18, zur Bestimmung von Alkalischer Phosphatase, umfassend ein erstes Teilreagenz, das eine peroxidische Verbindung enthält, ein zweites Teilreagenz, das einen geeigneten Puffer enthält und ein weiteres Teilreagenz, das ein chromogenes Substrat der Alkalischen Phosphatase enthält.
21. Reagenzienkit nach Anspruch 17 oder 18 zur Bestimmung von  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase, umfassend ein erstes Teilreagenz, das eine peroxidische Verbindung enthält, ein zweites Teilreagenz, das einen geeigneten Puffer enthält und ein weiteres Teilreagenz, das ein chromogenes Substrat der  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase enthält.
22. Verwendung von peroxidischen Verbindungen zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch freies Hämoglobin hervorgerufen werden, bei der Bestimmung eines Analyten in einer Probe.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

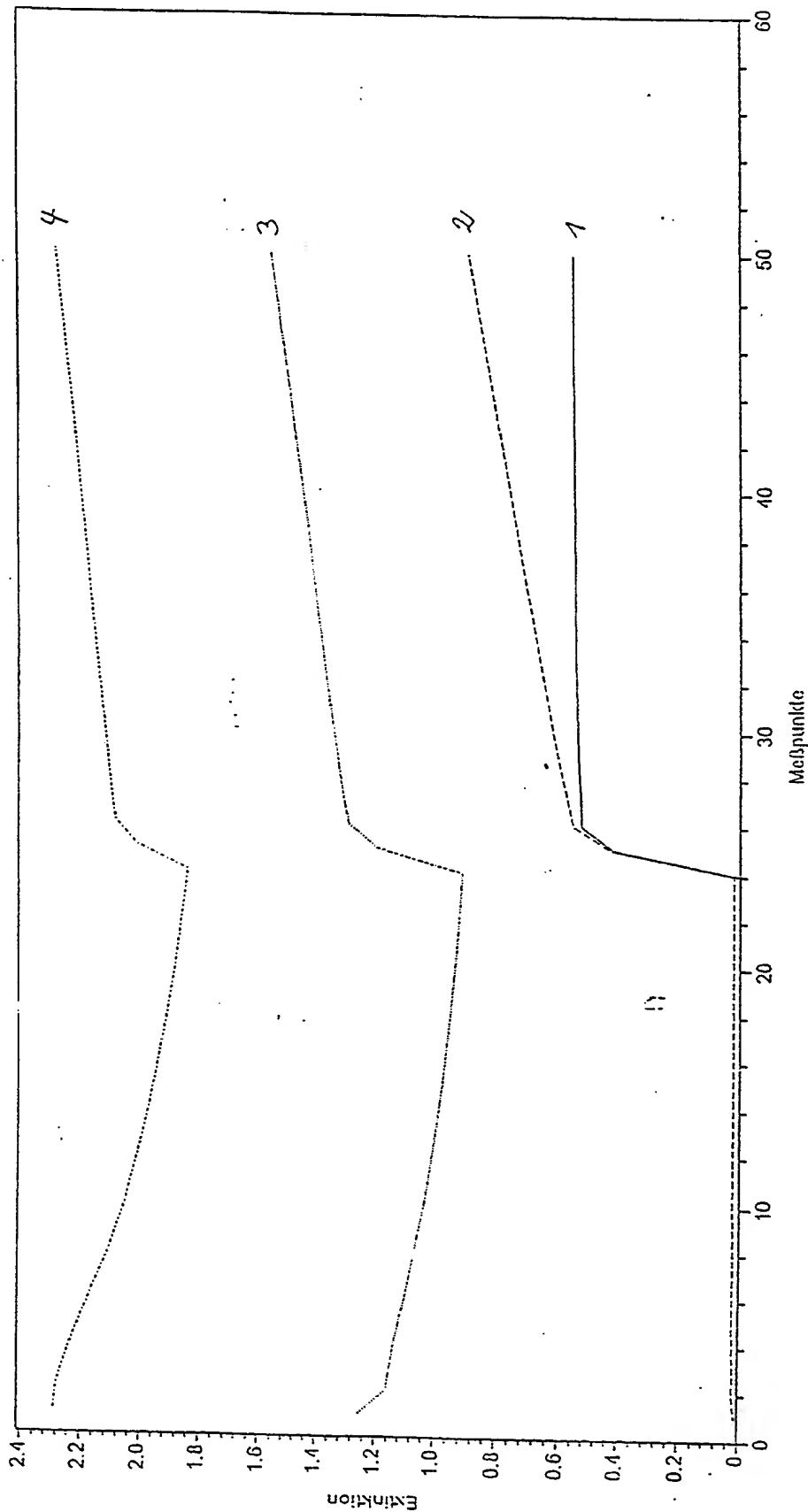


Abb. 1

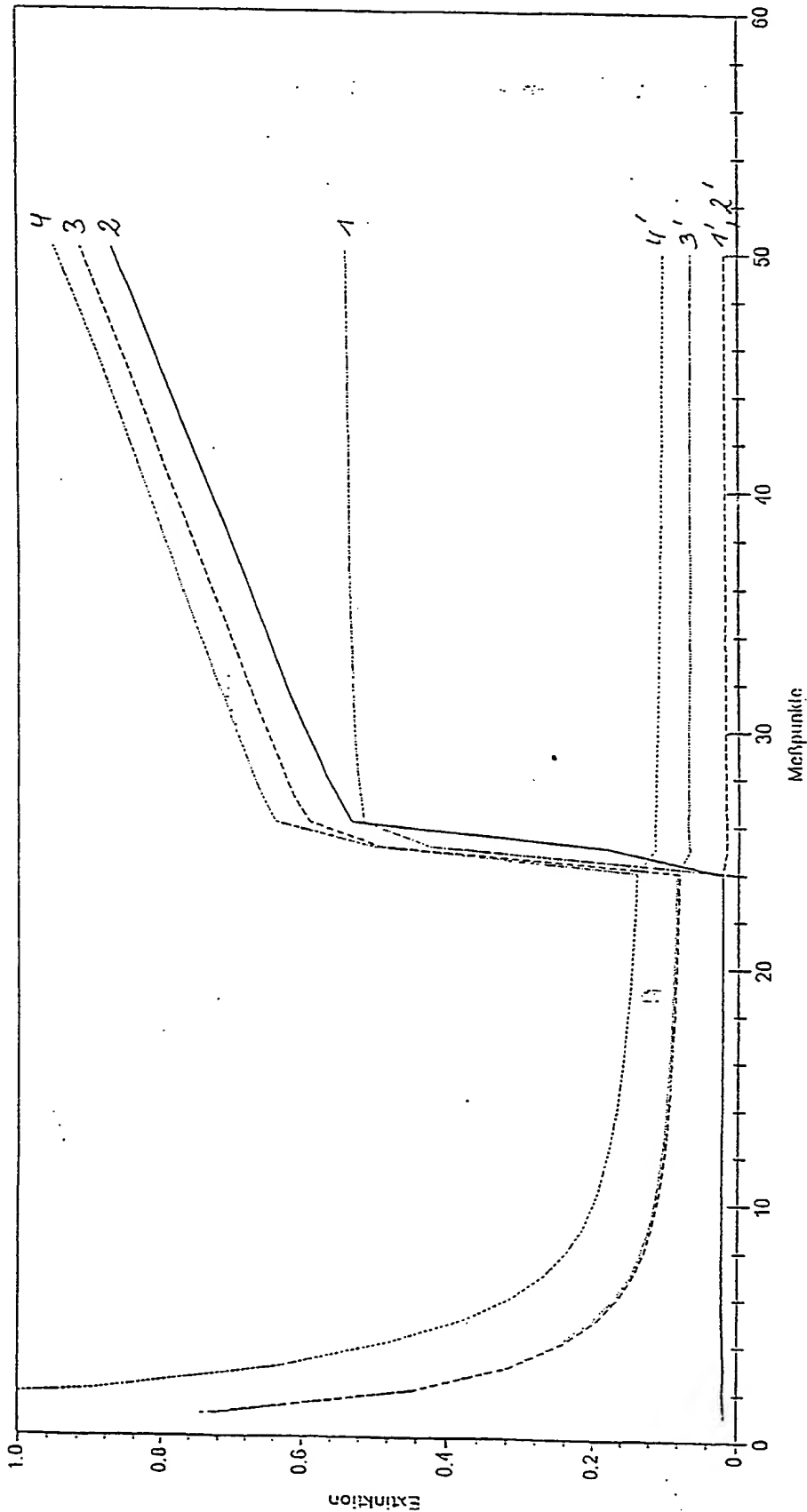


Abb. 2

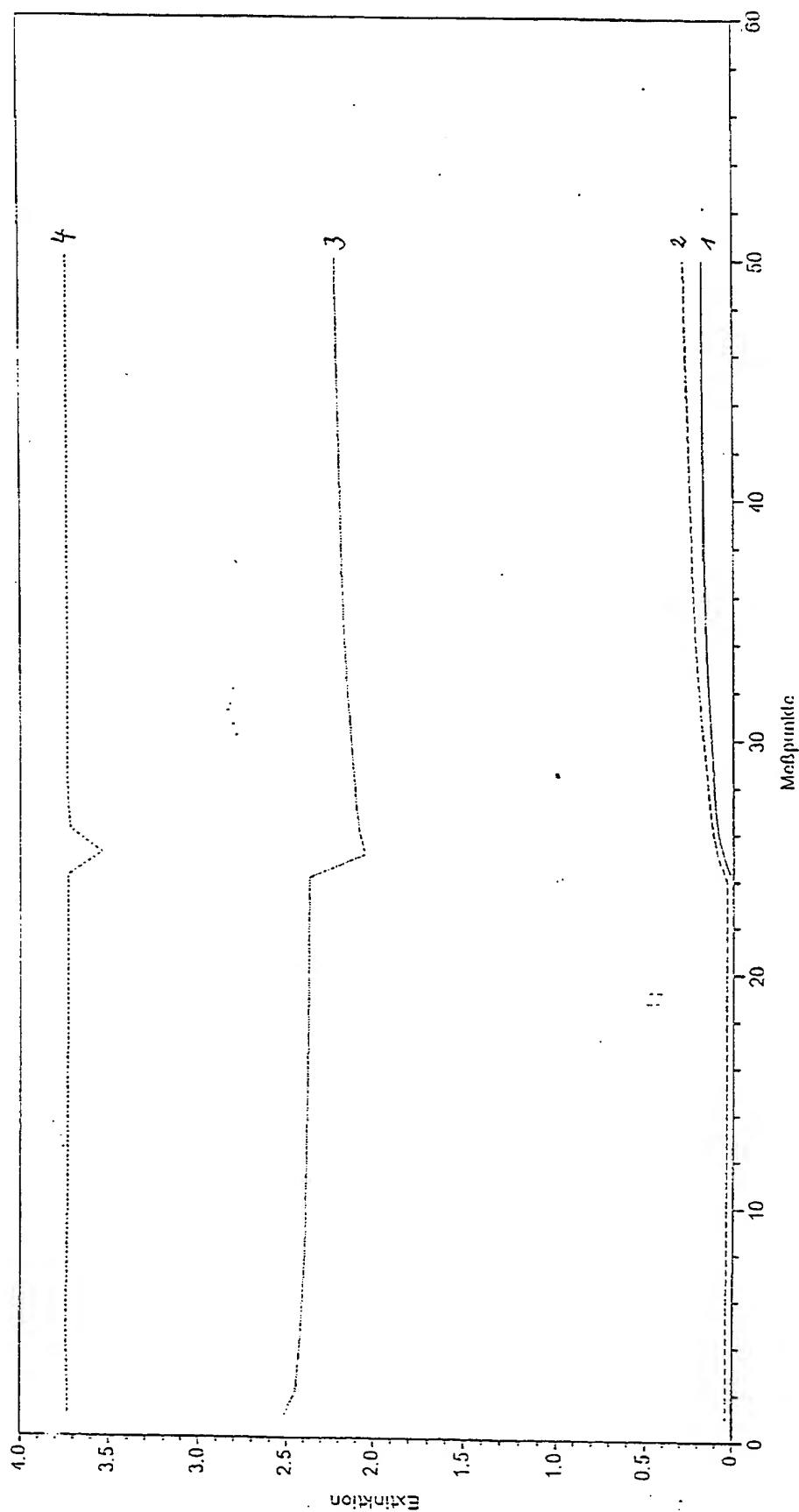


Abb. 3



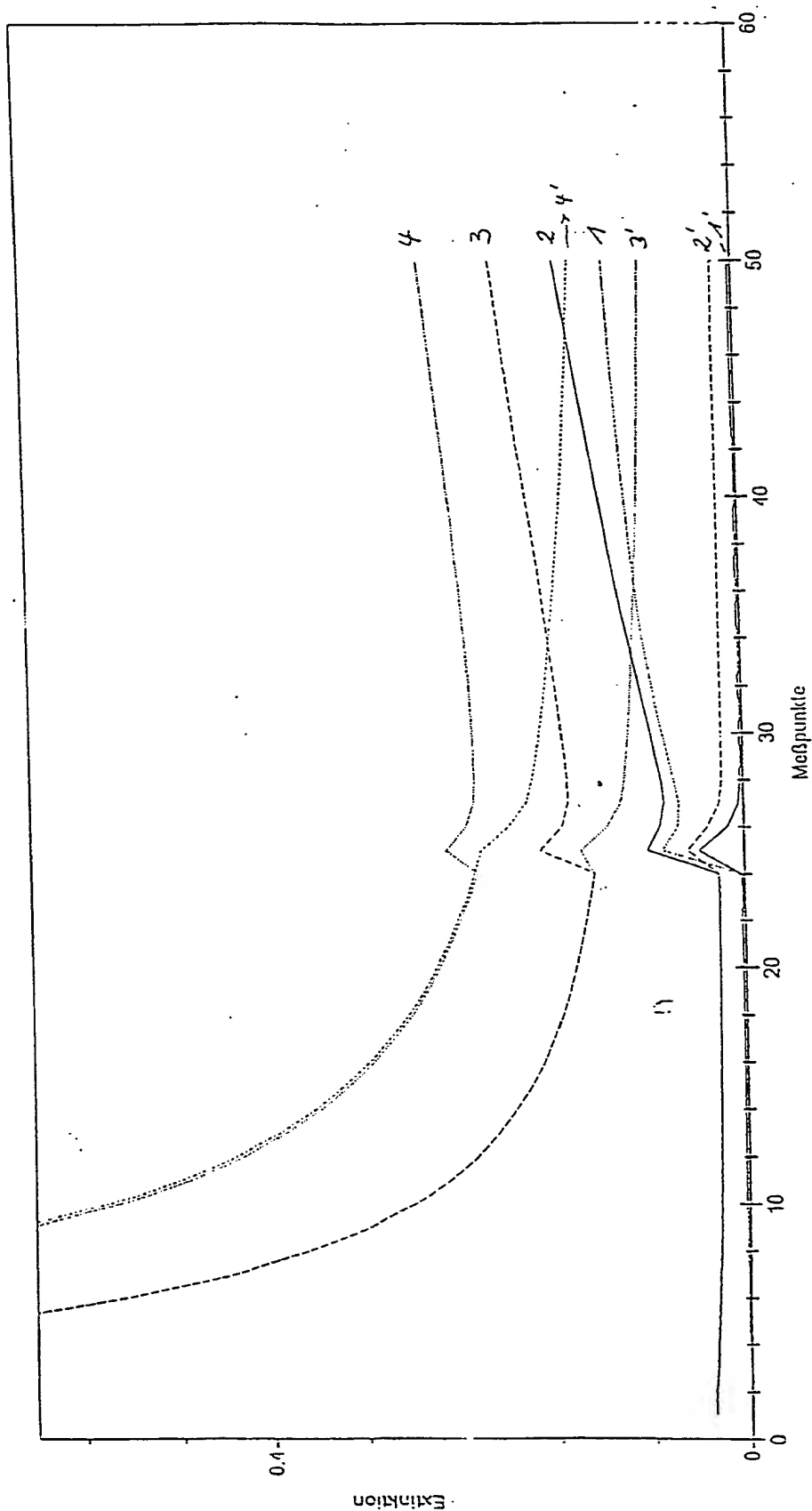


Abb. 4

702 064/116

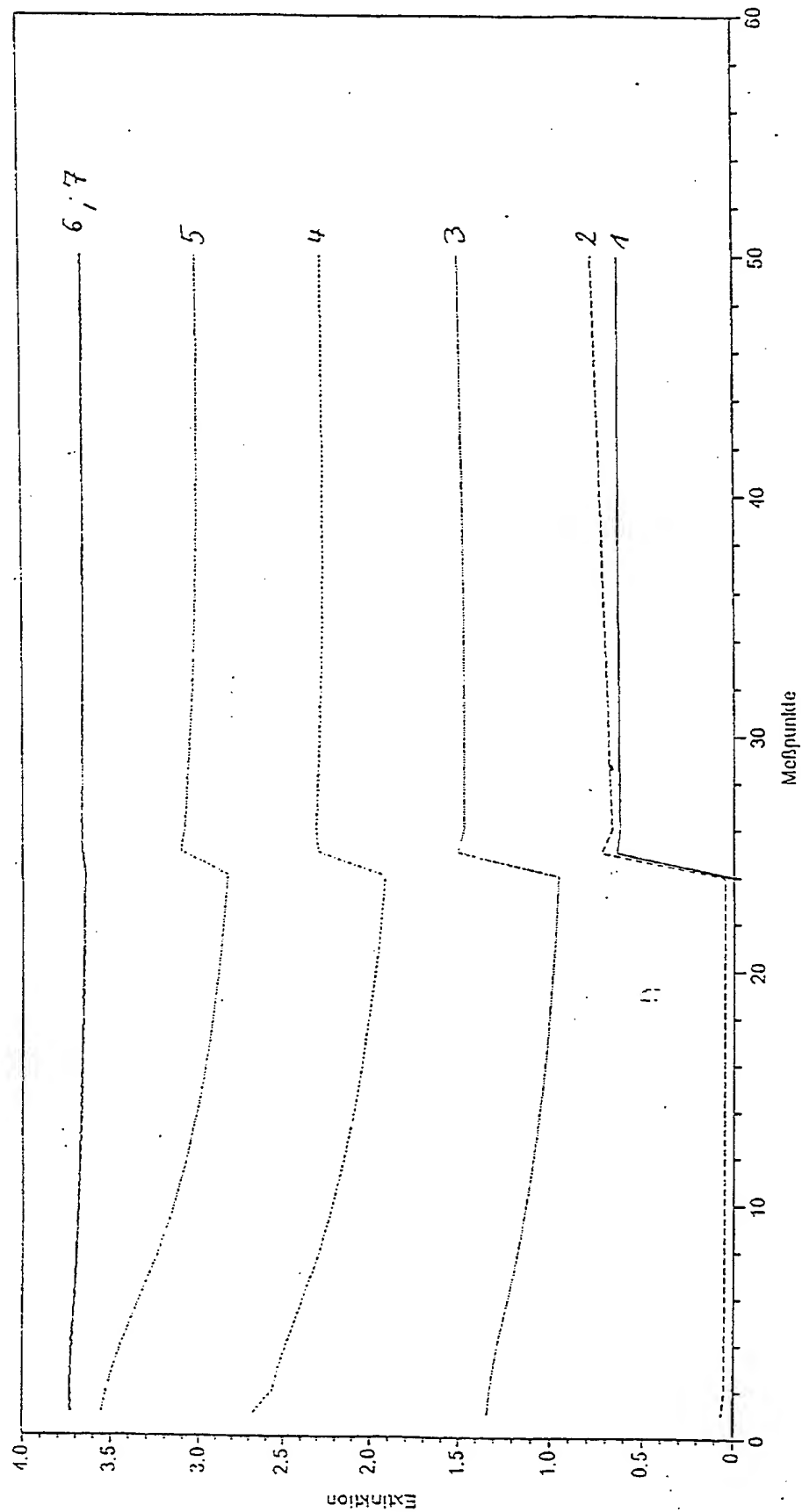


Abb. 5

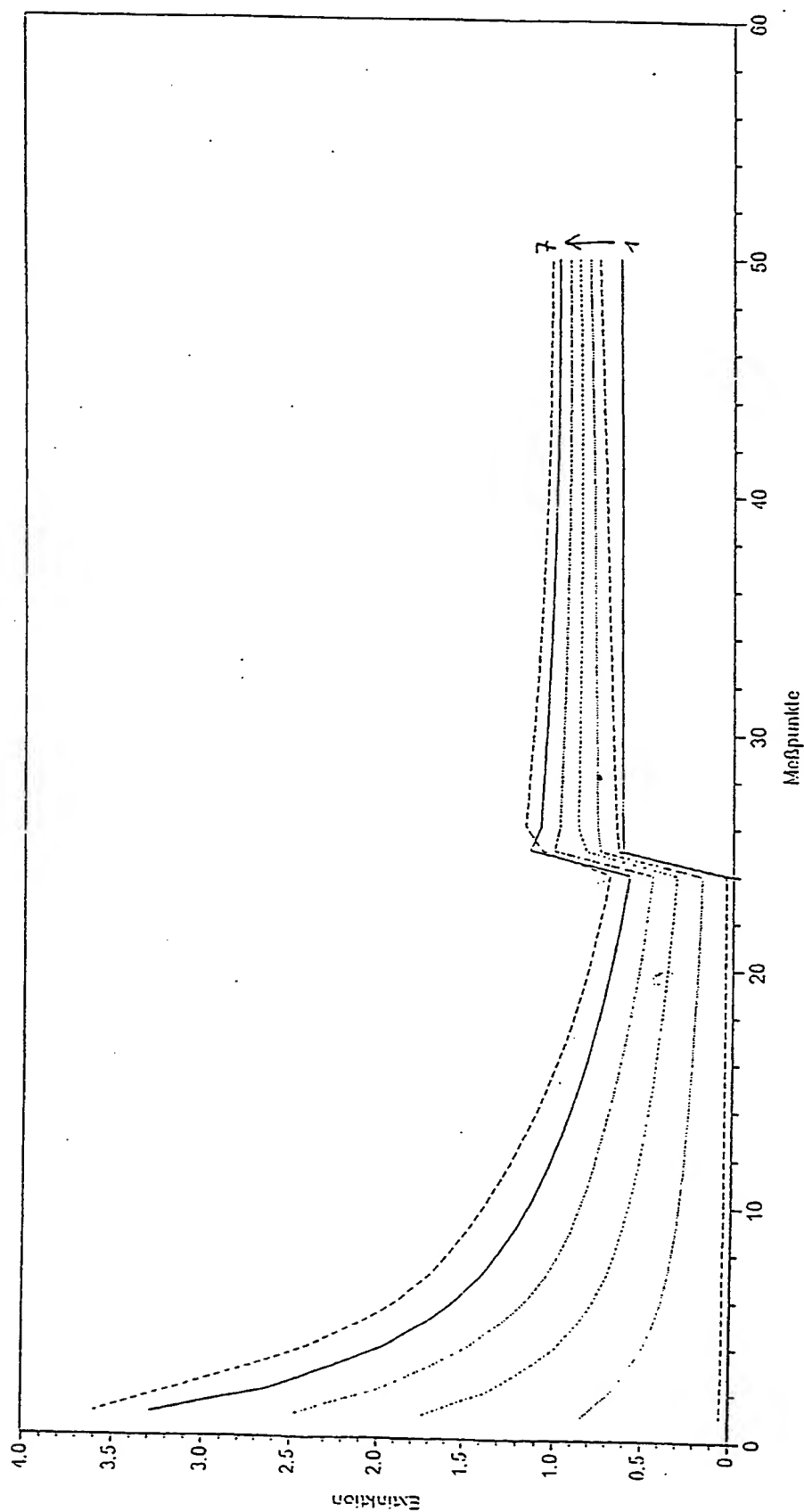


Abb. 6

702 064/116

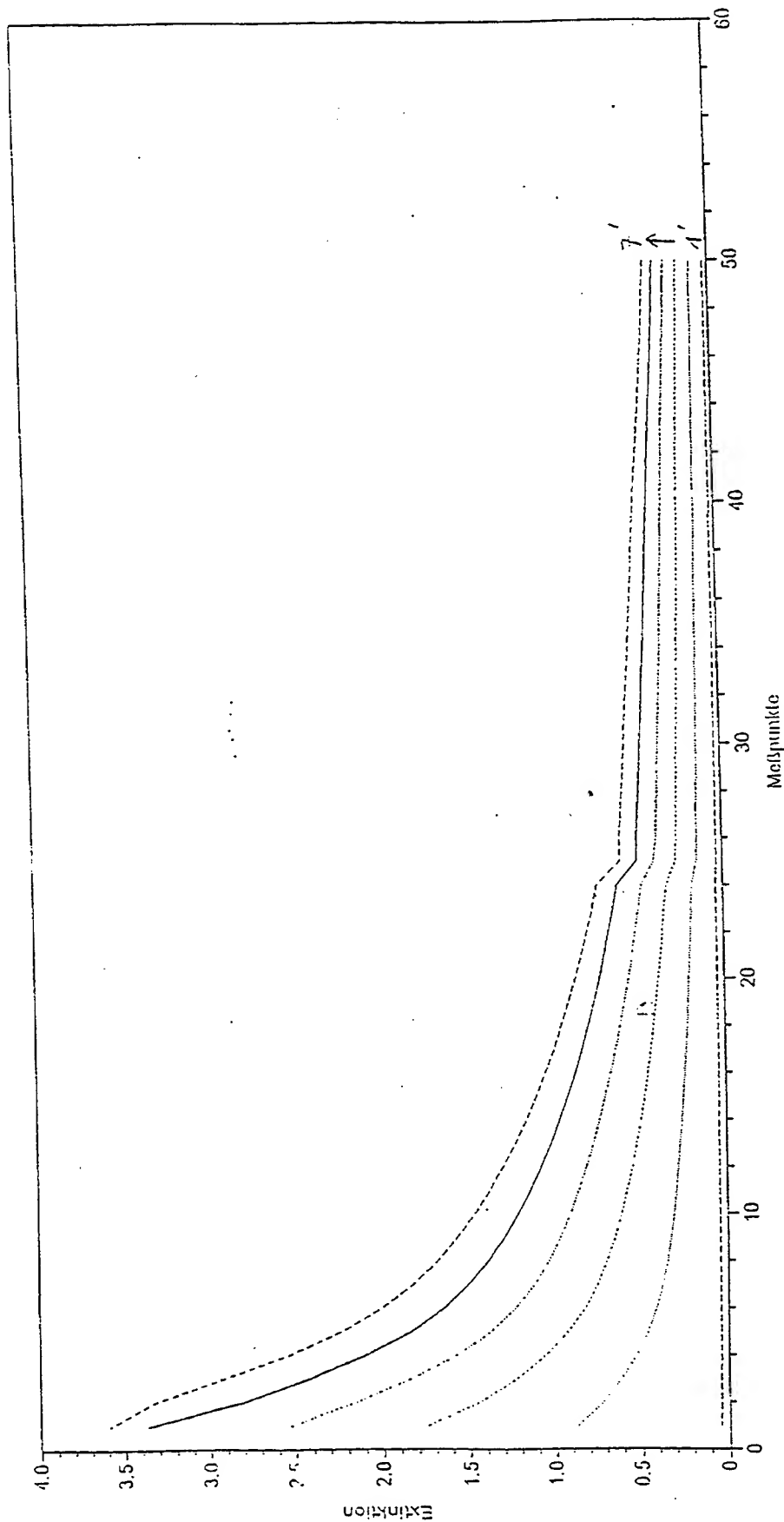


Abb. 7